

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológia Doktori Iskola

Összehasonlító Neurobiológia Program

**A cerebellum Purkinje sejtrétegének
változása posztnatális életkorban**

PhD tézisek

Vastagh Csaba

Témavezető:

Dr. Takács József

PhD

PÉCS, 2006.

Bevezetés

A kisagy (cerebellum) elsősorban az érző- és mozgatóműködések integrációjáért, a mozgatóműködések szabályozásáért felelős utóagyi struktúra. Fő funkciója a mozgáskoordináció; az érző és mozgatópályákon át beérkező információk feldolgozása révén összehasonlítja a tervezett és a folyamatban lévő mozgást, és a mozgás végrehajtásának hibáit korrigálja. Részt vesz az izomtónus szabályozásában, a szemmozgások vezérlésében, a mozgások ismétlődés és gyakorlás által finomodó mintázatainak elsajátításában, és számos kognitív tevékenységben is. Emlősökben két féltekére, és az azokat összekötő vermisre tagolható. Felszínén transzverzális lefutású foliumok és hasadékok láthatóak; ez utóbbiak a lebenyeket választják el egymástól. Kéreg- és velőállomány építi fel. Szöveti szerkezetét tekintve a kisagykéreg három rétegből áll, és hét fő idegsejt típus építi fel. A fehérállományhoz közelebb lévő szemcsesejt rétegben találhatóak maguk a szemcsesejtek, az unipoláris ecsetsejtek, valamint a gátló természetű Lugaro- és Golgi-sejtek. A pia mater alatt a molekuláris rétegben vannak a szintén GABAerg csillagsejtek és kosársejtek. E két szövettani réteg között található a Purkinje sejtek (Ps) rétege, amely a Ps-ek perikarionjaiból áll. A Ps-ek GABAerg projekciós neuronok, axonjuk a kisagykéreg egyetlen kimenete, amely kisagymagvak illetve egyes agytörzsi magvak idegsejtjeivel kapcsolódik.

A kisagykéreg két fő bemenetet kap, egyrészt az olivocerebelláris kúszórostok, másrészt a különböző eredetű moharostokon formájában, előbbiek egy-egy Purkinje-sejt dendritfáján, utóbbiak a szemcsesejtek dendritjein képeznek serkentő szinapszisokat.

Morfo-funkcionális szempontból a kisagykéreg vestibulo-, spino-, és a cerebrocerebellum-ra különíthető el. A mediális elhelyezkedésű vermis elsősorban a spinocerebellum része, amely bemeneteit főként a vestibuláris labirintus és az axiális, törzsi testtájak felől kapja. A vermis mellett az intermediér zóna is kap spinocerebelláris bemeneteket. A vestibulocerebellum a vestibuláris reflexek (fej-nyak-szemmozgások szabályozása), valamint az egyensúly szabályozásában játszik igen fontos szerepet. A cerebrocerebellum, a féltekék oldalsó része, elsősorban mozgatókérgi bemeneteket kap.

A kisagy idegsejtjeinek germinális zónája a fejlődő metencephalon neuroepitheliuma a IV. agykamra területén. Rágcsálókban a kisagy-primordium alatt húzódó ventrikuláris zónában, mint elsődleges germinatív zónában az idegi prekursorok osztódásai zömmel az intrauterin egyedfejlődés folyamán, míg a külső szemcsesejt rétegben (EGL), mint másodlagos germinatív zónában, döntő mértékben posztnatálisan történnek. A szemcsesejtek kivételével az összes kisagykérgi neuron valamint a csillag- és kosársejtek prekursorai a ventrikuláris zóna neuroepitheliumában születnek és részben az embrionális fejlődés során, részben posztnatálisan vándorolnak a fejlődő kéregbe. A posztmitotikus Ps-ek egerben az E14 és E17 napok között vándorolnak, és a születés idejére az összes Ps a leendő stratum

ganglionare közelében, a külső és belső szemcsesejt réteg között található, a legtöbb kisagylebenyben több sejtsorban, és ezekből fokozatosan alakul ki a Ps-ek kisagyra jellemző egysoros [monolayer] sejtrétege. A migrációs hullám latero-mediális illetve poszteroventrál – anterodorzális irányban, igen szigorú tér-időbeni rendezettséggel zajlik. A fejlődő laboratóriumi egér kisagyában az egy sejtréteges elrendeződés a későn fejlődő kisagyterületeken csak a P8-P10 körüli időszakra alakul ki.

A kisagykéreg posztnatális fejlődési plaszticitásának vizsgálata során perinatális/posztnatális korú egerek és kismacskák kisagyában nagyszámú, differenciálatlan „extralamináris”, azaz kisagykérgi citoarchitektonikus szerkezetben elfoglalt megszokott helyükön kívül elhelyezkedő Ps-et találtunk mGluR1 α és egy nem foszforilált neurofilament (SMI-311) immuncitokémiai, valamint toluidinkék festés után. A kéreg meghatározott területein a Ps-ek teljesen hiányoztak. Az egyedfejlődés későbbi szakaszaiban azonban ezek a hiányok fokozatosan eltűntek, a Ps réteg végül folytonossá vált. Kísérleteink során, egereken a születés után alkalmazott BrdU kezelés azon túlmenően, hogy megjelölte a külső szemcsesejt réteg proliferáló szemcsesejtjeit, meglepően nagymértékben befolyásolta a Ps-ek születés utáni migrációját, illetve a ganglionáris sejtréteg kialakulását.

A kisagy az emlős központi idegrendszer egyik, ha nem a leghosszabb ideig fejlődő régiója. Régóta ismeretes, hogy neuronhálózatának teljes kiépülése csak jóval a születés után fejeződik be, és jelentősen befolyásolhatják az idegrendszert a posztnatális fejlődés során érő különböző külső (környezeti) és belső hatások. Ez nagyfokú plaszticitást, ugyanakkor igen nagy sérülékenységet is jelent. Az elhúzódozó fejlődés valamint az azt károsító hatások részleteinek jobb megismerése hasznos lehet a kisagyfejlődés zavarainak megelőzésében, vagy talán még gyógyításában is.

Célkitűzések

- 1.) Milyen különbségek mutathatók ki hagyományosan gyorsan és lassan fejlődő kisagyi területeken (adott kisagylebenyekben) az egysejtes Ps réteg kialakulásában, és utóbbi mely posztnatális életkorra tehető?
- 2.) Milyen az extralamináris Ps-ek eloszlása a fejlődő kisagykéregben?
- 3.) Mérhető-e szignifikáns változás a ganglionáris réteg „lamináris” Ps-jeinek számában a születés után, a teljes kisagyra vonatkozóan, a legújabb, és szigorú kritériumok alapján alkalmazott sztereológiai/morfometriai módszerekkel?
- 4.) Melyek a posztnatális bróm-dezoxiuridin (BrdU) kezelés szomatikus-és kisagyfejlődést károsító hatásai, egérben?

5.) BrdU kezelést követően milyen a posztnatális fejlődésükben (migrációjukban) megrekedt Ps-ek eloszlása a kisagykéregben?

6.) Mi lesz a sorsa az ektopikus helyzetben megrekedt Ps-eknek?

Anyagok és módszerek

A kísérletekben alkalmazott módszerek, a felhasznált állatok és életkoruk összefoglalása:

Cél	Módszer	Állat	Korok
A Ps-réteg kialakulásának vizsgálata	Toluidinkék festés	Egér (18)	P0, P3, P6, P8, P15, P21
		Macska (9)	P0, P14, P42
A Ps-ek fejlődése macskában	mGluR1 α immuncitokémia	Macska (12)	P0, P8, P22, P42
A Ps-ek fejlődése egérben	mGluR1 α immuncitokémia	Egér (18)	P0, P3, P6, P8, P15, P21
	CaBP immuncitokémia	Egér (15)	P6, P9, P12, P16, Ad.
A III-as és VI-os lebenyek Ps számának meghatározása	CaBP pozitív Ps-ek számolása	(előzővel azonos)	P6, P9, P12, P16, Ad.
A Ps réteg növekedésének meghatározása	Ps réteg hosszának mérése	Egér (27)	P0, P3, P4, P6, P12, P15, P18, P21, AD
A Ps-ek teljes számának meghatározása	Sztereológia/morfometria; optikai frakcionátor	Egér (9)	P8, P21, AD
		Macska (12)	P0, P42, P72, AD
A kisagy fejlődésének „megzavarása”	BrdU kezelés-sorozat	Egér (75)	P0-P21, AD

Eredmények és megbeszélés

A Ps-ek rétegének fejlődése laboratóriumi egér kisagykéregében

A Ps-ek beépülése a kisagykéregbe

Vizsgálataink során a Ps-ek alkotta ganglionáris réteg kialakulását tanulmányoztuk a születésük után egerek kisagyában. A hagyományos szövettani, és az immuncitokémiai jelölések révén azonosítottuk a Ps-eket. A Ps-réteg hossza a vermis mediánszagittális

metszetein mérve mintegy 6-7-szeresére nő a Ps-ek születés utáni, rosztro-kaudális sorbarendeződésének következtében. Újszülött (P0) egerekben a Ps-ek szabálytalan rétegekbe rendeződtek a vermis több régiójában, illetve elszórtan, a medulláris parenchimában fordultak elő. A 3. és 4. posztnatális napra a Ps-ek többrétegű sorokba rendeződve láthatók, kivéve a VI.-VII. lebenykék dorzális részét, és részben a VIII. lebenykét. P6 és P8 korra a Ps-ek kialakították a maguk többé-kevésbé szabályos egysejtes rétegét, a ganglionáris réteget, azonban a VI.-VII. lebenykék dorzális részein továbbra is szabálytalan Ps elrendeződés volt látható. P12/15 napokon a VI-os lebenyke bizonyos területein a Ps-ek hiányoztak a ganglionáris rétegből. P21 korra, az EGL eltűnésével fejeződik be a kisagy sejtjes szerkezetének kialakulása.

A vermis lebenyeinek morfogenezisét és fejlődésdinamikáját vizsgálva megállapítottuk, hogy a VI-os és VII-es lebenyke a többi lebenykétől eltérően fejlődik. A Ps-ek egysejt-rétegbe való rendeződése a VI-os lebenyke dorzális területén és a VII-es lebenykében tart a leghosszabb ideig, (a születés után 15-16 napig) azaz a vizuo-motor vermis fejlődése és ganglionáris rétegének kialakulása a vermis többi lebenyeihez viszonyítva később fejeződik be. Eredményeink további adatokkal támasztják alá a megfigyelést, hogy a kisagy a születés után még meglepően hosszú idei fejlődik, és nem kivétel ez alól a Ps-ek rétege sem. Különböző korú egyedek vizsgálata során kiderült, hogy a felnőttben jól ismert, szabályos egysejtes réteg kialakulásának folyamata [alignment] előbb lezajlik a korábban fejlődő (anterior illetve mediális) mint a hagyományosan későn fejlődő (poszterior ill. laterális, valamint a vermis VI-os és VII-es lebenykéje) területeken.

CaBP immunpozitív Ps-ek száma az okulomotoros vermisben

Egy Ca kötő fehérje, a Calbindin (CaBP) immunhisztokémia alkalmazásával is vizsgáltuk a Ps-ek sorba rendeződésének és morfogenezisének dinamikáját egerek

fejlődő kisagykérgében. Az egy sorba rendeződött CaBP immunpozitív Ps-ek száma fokozatosan növekedett P6 és a fiatal felnőttkor között a VI.-VII. lebenykékben 100 sejtről 150 sejt/sorra; ez 50% növekedést jelent. A III-as lebenyében is kimutatható volt a Ps-ek számának a növekedése P6 és P16 kor között 76-ról 105 sejt/sorra, amit egy a fiatal felnőttkorig tartó mérsékelt, nem szignifikáns csökkenés követett (összességében 24 %-os növekedés). A számadatok is azt támasztják alá, hogy a VI-os és VII-es lebenyke a többi lebenykétől eltérően fejlődik. Ezekben a lebenykékben a szagittális sorokba (egysejtes rétegbe) rendeződött CaBP pozitív Ps-ek számának a növekedése lassúbb folyamat és időben tovább tart a viszonylag korán fejlődő elülső III-as lebenykéhez képest.

Valószínű, hogy a Ps-ek többsége nem expresszálja a CaBP-t mindaddig, amíg el nem kezdődik differenciálódásuk - azaz dendritfájuk növekedése illetve remodelációja - végleges helyükön, a ganglionsejt rétegben (vagy ektopikus pozícióban). Minden bizonnyal ez az oka annak, hogy a VI-os és VII-es lebenykék mélyebb rétegeiben nem találtunk CaBP immunpozitív Ps-eket.

Purkinje sejtek számának változása a kisagykérgében születés után

Irodalmi adatok csak szórványosan fordulnak elő a Ps-ek számának születés utáni alakulását illetően, ezért munkánk fontos részét képezte, hogy meghatároztuk a Ps-ek számát fejlődő (és a felnőtt) egér kisagyában. Adataink szerint 11,5%-kal növekedett a Ps-ek száma posztnatális P8-tól P20-napig illetve 13,4%-kal fiatal felnőttkorig, a teljes kisagyra vonatkoztatva. A növekedés a stratum ganglionare-ban, tehát a kisagyi citoarchitektonikus szerkezetben elfoglalt végleges helyükön lévő Ps-ek számában is a későn vándorló, (extralamináris) Ps-ek szubpopulációjának létezésére utal. Ennek a kisebb Ps szubpopulációnak késői, elhúzódó vándorlása és beérkezése a Ps laminába megfigyeléseink

szerint döntő mértékben a második posztnatális hét folyamán megy végbe, de kisebb mértékben – főleg a később fejlődő kisagyterületeken – folytatódhat a harmadik születés utáni héten is. A vizuo-motor vermis elhúzódó fejlődése (a késői Ps vándorlás és integrálódás) összefüggésbe hozható fokozott sérülékenységgel.

A Ps-ek rétegének fejlődése házimacska kisagykérgében

Morfológiai változások nyomon követése toluidinkék festéssel és mGluR1a immunhisztokémia alkalmazásával

A P0 kortól kezdődően egyes későn fejlődő neocerebellaris és vermalis területeken megfigyelhető két sejtsoros Ps elrendeződés a P14 korra szabályos egysejtes réteggé alakult. A Ps-ek meghatározott területeken sávokban hiányoztak egészen a 3. posztnatális hétig. P42 napos korban a Ps-ek szabályos egysejt réteget képeztek a teljes kisagy területén.

Újszülött (P0) macskák kisagykérgében már határozott mGluR1 α immunreakció volt látható a Ps-ek perikarionjában és dendritjeiben, ugyanakkor szagittális irányú sorozatmetszeteken a Ps réteg sejthiányos részei egyértelműen láthatóak voltak. Egy-egy ilyen Ps-mentes területen mintegy 15-25 ganglionsejt (Ps) hiányzott. A sejthiányos területek közelében, valamint a fehérállomány területén differenciálatlan, mGluR1 α pozitív, éretlen (extralamináris) Ps-ek gyakran csoportokban jelentek meg egészen a P7 korig. P22 kortól nagyobb kiterjedésű Ps-hiányok már nem voltak láthatóak. Az extralamináris (EGL-ben, kisagykarak területén, az agytörzs dorzális részén és a kisagyi fehérállományban megjelenő) Ps-ek száma fokozatosan csökkent, végül a felnőttkorra eltűnt.

A Ps-ek számának változása a születés után macskák kisagykérgében

A Ps-ek száma a 72 napos ($1,896 \pm 0,105 \times 10^6$) és a felnőtt macskák ($1,429 \pm 0,064 \times 10^6$) kisagyában szignifikánsan különbözött az újszülött macskákban mért ($1,097 \pm 0,094 \times 10^6$) Ps számtól. ($P=0,0024$; P0 és összehasonlításban P72 $p<0,01$. ANOVA: $F_{3,7} = 13.02$; $P < 0,003$; Bonferroni: $P < 0,01$). A növekedés mértéke P0 és P0 és P72 között 72% volt, P0 és felnőtt között 30%.

Eredményeink azt mutatják, hogy macskában is létezik egy hosszú idejű, születés után végbemenő növekedés a ganglionáris réteg Ps-jeinek számában, aminek mértéke összességében mintegy 30 %. Perinatális korú macskák fejlődő kisagykérgében megfigyeltük, hogy a ganglionáris rétegben eléggé gyakoriak a „hézagok”, ahol a Ps-ek hiányoznak. A kvantitatív vizsgálataink során megfigyelt sejtszám változás, (azaz a lamináris Ps-ek abszolút számának növekedése) a születés utáni egy-két hét során valószínűleg úgy mehet végbe, hogy a ganglionáris réteg Ps hiányos területeit „kitöltik” a perinatális korban megfigyelhető „extralamináris”, mGluR1 immunfestéssel megjeleníthető, differenciálatlan (vándorló?) Ps-ek.

Eredményeink arra utalnak, hogy a posztnatális korban feltehetően újabb Ps-ek is beépülnek a fejlődő Ps-laminába mindkét vizsgált faj esetében.

A születés utáni BrdU kezelés hatása egerek szomatikus- és kisagyfejlődésére

A BrdU kezelések testi fejlődésre gyakorolt hatása

A kisagy posztnatális fejlődési plaszticitásának tanulmányozásához kidolgoztunk egy olyan modellt (különböző idejű és időtartamú BrdU kezelés), melynek segítségével a kisagy

különböző mértékű károsodását lehetett előidézni. C57Bl6 egereket születésük után BrdU-val injektáltunk, egy viszonylag kis (50mg/kg testsúly) dózisban. A P0 korban elkezdett és legalább tíz napos kezelés-sorozat jelentős szomatikus retardációt, és szignifikáns testsúly-csökkenést eredményezett. A testsúly csökkenés/különbség fiatal felnőtt korig (P120) megfigyelhető volt, a kontroll csoportok egyedeivel összehasonlítva.

A BrdU kezelés hatása az idegrendszer fejlődésére

A BrdU-val történő kezelések hatására az agy mérete is csökkent. Szembetűnő volt a vermis átmetzeti területének és a ganglionáris réteg hosszának csökkenése, valamint a kisagy citoarchitektonikus szerkezetének károsodása. P0-P11 korban kezelt egerek kisagykérgében a ganglionáris réteget szabálytalan, gyakorta több sorban elhelyezkedő Ps-ek (illetve azok sejtteste) alkották.

Változások a lebenyke szerkezetben

BrdU kezeléseket követően a vermis lebeny-szerkezete alapján megtartott, finomabb lebenyke szerkezeti károsodások azonban világosan láthatók voltak a kezelt egerek kisagyaiban, melyek jobbára a későn fejlődő IV.-V. (jellegzetes alakjuk nem alakul ki) illetve VI.-VII-es lebenyekre korlátozódtak, ez utóbbi esetben az allebenyek nem különültek el.

A szemcsesejt réteg fejlődésének zavarai

A posztnatális BrdU kezelés hatására zavart szenvedett a szemcsesejtek vándorlása: azok kisebb csoportjai a külső szemcsesejt rétegben (EGL) megrekedtek, illetve a születés után három héttel (P21) még láthatóak voltak, elsősorban a későn fejlődő VI.-VII. lebenykék dorzális területein. P0-P11 napon történt kezeléseket követően felnőtt korig (P120) is megfigyelhetők voltak ektopikus helyzetben megrekedt kisebb szemcsesejt-csoportok a pia mater alatt.

A Ps réteg fejlődésében bekövetkező változások

A fejlődő kisagykéregben a BrdU kezelés látványosan érintette a Ps-ek kisebb nagyobb szubpopulációit is, ami elsősorban abban nyilvánult meg, hogy az érintett Ps-ek nem vándoroltak a helyükre és nem integrálódtak a ganglionáris rétegbe. Ektopikus Purkinje sejteket találtunk nagy számban a relatíve később kialakuló rosztrális – neocerebellaris - kisagyi területeken (lobulus simplex, lobulus anterior) flocculus/paraflocculus lebenyekében, valamint a szintén későn fejlődő vizuo-motor vermisben (declive, tuber) továbbá a mesencephalon/metencephalon határán a IV. agykamra szubventrikuláris zónájában. Ektopikus pozícióban lévő Ps-eket egyaránt megfigyeltünk a kialakulófélben lévő belső szemcsesejt rétegben, a belső szemcsesejt réteg/fehérállomány határán és a lebenyekék fehérállományában

Vizsgálataink szerint a BrdU kezelés hatékonysága két tényezőtől függött: a kezelés megkezdésének idejétől, illetve a kezelés időtartamától. A BrdU kezelés elsődlegesen a szemcsesejtek (és prekursoraik) károsodását, számuk csökkenését eredményezte. Késleltette, illetve gátolta a morfogenetikus folyamatokat, a Ps-ek szabályos rétegbe rendeződését, továbbá mérsékelt szemcsesejt ektópiát okozott; összességében a kisagyfejlődést jelentős mértékben retardálta, ami cerebellaris hypopláziához és maradandó citoarchitektonikus szerkezetkárosodáshoz vezetett. A korai (P0-tól) BrdU kezelés egerek fejlődő kisagykéregben fokozottan érintette a Ps-ek azon szubpopulációját, melyek - feltételezésünk szerint - csak a születés után, egy elnyújtott fejlődési periódus során vándorolnak és integrálódnak a

ganglionáris rétegbe. Véleményünk szerint a BrdU kezelés elsősorban ennek a Ps szubpopulációnak a migrációját akadályozta, továbbá gátolta normális időrendben történő integrálódásukat a ganglionáris rétegbe, és jelentős mértékű Ps-ektópiát eredményezett.

Az eredmények összefoglalása

1.) Egerek vermisében a gyorsabban fejlődő III. lebenyke és a legutoljára fejlődő vizuo-motor vermis (VI.-VII. lebenyke) fejlődésdinamikájában nagyjából egy hét különbséget figyeltünk meg, utóbbi területen a Ps-ek egysejtes rétege a posztnatális 15-16. napra alakul ki.

2.) Extralamináris Ps-ek a fejlődő kisagykéreg mélyebb rétegeiben, majdani helyüktől jelentősebb távolságban a születés utáni két-három hét során megfigyelhetők és azonosíthatók voltak (egérben félvékony metszeteken, macskákban mGluR1 α immunreaktivitásuk és morfológiájuk alapján).

3.) A fejlődő kisagykéreg posztnatálisan kialakuló ganglionáris rétegében a Ps-ek számának szignifikáns növekedését figyeltük meg egerek és macskák kisagyában, szigorú kritériumok alapján alkalmazott sztereológiai módszerekkel.

4.) A születés után alkalmazott BrdU kezelés egerek szomatikus-és kisagyfejlődésének retardációját okozta a kezelés megkezdése időpontjának, és tartamának (a bevitt BrdU dózisének) függvényében. Elsődlegesen a gyorsan proliferáló szemcsesejtek károsodtak, de igen jelentősek a születés után vándorló Ps-ek migrációs és integrációs zavarai is.

5.) Ami vándorlásukban megrekedt Ps-ek eloszlását illeti, ezeket a sejteket az egész kisagykéregben megfigyeltünk, legnagyobb számban a neocerebellumban, a flocculus/paraflocculus valamint a későn fejlődő vizuo-motor vermis lebenykéiben.

6.) Az ektopikus helyzetben megrekedt Ps-eknek egy hányada képes - kevésbé szabályosan - integrálódni a ganglionáris rétegbe, a fehérállományban megrekedt Ps-ek azonban nagyjából elhaltak, kisebb részük mint ektopikus sejt azonosítható.

Publikációs jegyzék

A disszertáció alapjául szolgáló közlemények

Takács J, Borostyánkői ZA, Veisenberger E, **Vastagh Cs**, Víg J, Görcs TJ, Hámori J. 2000. Postnatal development of unipolar brush cells in the cerebellar cortex of cat. J Neurosci Res 61:107-115.

Vastagh Cs, Víg J, Hámori J, Takács J. 2005a. Delayed postnatal settlement of cerebellar Purkinje cells in vermal lobules VI and VII of the mouse. Anat Embryol (Berl) 209:471-484.

Vastagh Cs, Víg J, Takács J, Hámori J. 2005b. Quantitative analysis of the postnatal development of Purkinje neurons in the cerebellum of the cat. Int J Dev Neurosci 23:27-35.

A disszertáció alapjául szolgáló konferencia-kivonatok

Takács J, Borostyánkői Zs, **Vastagh Cs**, Víg J, Görcs T, Hámori J. 2000. Development of the cerebellar cortex in cats. Neurobiology 8(3-4):404

Vastagh Cs, Takács J, Hámori J. 2001. The number of Purkinje cells changes during postnatal development in the cerebellar cortex of cat. Neurobiology 9(3-4):272

Takács J, Víg J, **Vastagh Cs**, Hámori J. 2003. Effect of BrdU on the postnatal development of

cerebellum. MITT IX. Conference, Balatonfüred, 2003. jan. 22-25. Clinical Neuroscience 56(suppl 2): 89

Takács J, Víg J, **Vastagh Cs**, Hátori J. 2003. Effect of 5-bromo-2'deoxyuridine (BrdU) on the postnatal development of cerebellum. 6th IBRO World Congress of Neuroscience, Prague, 2003. Sixth IBRO World Congress of Neuroscience, July 10-15, 2003, Prague, Suppl Eur J Neurosci, pp. 144.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Takács Józsefnek, Hátori József professzor úrnak, Dr. Víg Juliannának, a Pécsi Tudományegyetem Összehasonlító Állattani és Neurobiológiai Tanszéke munkatársainak, Magyar Tünde asszisztensnek, Árvai Antal technikusnak, valamint családom valamennyi tagjának, hogy segítették és támogatták az elmúlt évek során végzett munkámat.

UNIVERSITY OF PÉCS

Biology Doctoral School
Comparative Neurobiology Programme

Changes in the Purkinje cell layer of the cerebellum at postnatal ages

PhD thesis

Csaba Vastagh

Supervisor:

Dr. József Takács

PhD

PÉCS, 2006.

Introduction

Cerebellum („small brain”) is a rhombencephalic structure responsible for integration of sensory and motor functions. The main role of the cerebellum is the coordination of movements; it compares the inputs from the sensory and motor pathways and is responsible for a permanent (“real time”) correction of ongoing movements. It plays role in the regulation of the muscle tone, in the control of eye movements, in the motor skill, and in several cognitive functions. It consists of two hemispheres and the vermis in mammals, which are separated to lobules by fissures. The cerebellum can be further divided into cortex or gray matter and medulla or white matter.

Three histological layers and seven main neuronal types build up the cerebellar cortex. In the granular layer the granule cells and the unipolar brush cells as well as the inhibitory Golgi and Lugaro cells can be found. The neurons of the molecular layer are the GABAergic stellate and basket cells. Between this two histological layers, the Purkinje cell layer as a single cell layer is built up by the somata of the Purkinje cells (PCs). The PCs are also GABAergic inhibitory neurons; their axons are the sole source of the cerebellar output terminating on the neurons of cerebellar and vestibular nuclei.

The cerebellar cortex receives two main types of (excitatory) inputs: the olivocerebellar climbing fibers terminating on the PC dendrites, and the mossy fibers of various origins forming synaptic contacts on the dendrites of the granule cells.

The cerebellum can be divided to medial, intermedier, and lateral zones. The phylogenetically oldest region, the vestibulocerebellum plays important roles in the vestibular reflexes and in the regulation of balance. The medial zone of the vermis belongs to the spinocerebellum that receives afferents from axial parts of the body as well as vestibular inputs. The intermedier zone also receives spinocerebellar afferents. The cerebrocerebellum, actually the larger (lateral) part of the hemispheres receives inputs mainly from the motor cortex.

The germinal zone of the cerebellar neurons is the neuroepithelium of the developing metencephalon in the territory of the IVth ventricle. In rodents the ventricular zone is the primary germinative zone under the cerebellar primordium, where the neural precursors proliferate predominantly during the intrauterin life. On the contrary, in the external granular layer (EGL) as a secondary germinal zone of the cerebellum, cell proliferation occurs during the early postnatal age. Except for the granule cells all of the cerebello-cortical neuronal precursors are born in the neuroepithelium of the ventricular zone. They migrate towards the developing cortex during pre- and postnatal development. In the mouse post mitotic PCs migrate between E14 and E17 and they build up the ganglionic layer of the cerebellar cortex gradually. By the time of birth all PCs can be found in the vicinity of the presumptive ganglionic layer, between the EGL and the internal granular layer (IGL), forming multiple cell layers in most of the cerebellar lobules. The typical PC monolayer built up from these rows of cells, via their rostro-caudal and medio-lateral dispersion and alignment. The wave of migration takes place in latero – medial as well as posteroventral – anterodorsal direction in space, and is strictly controlled in time and space. In the developing mouse the PC monolayer appears only by 8-10 postnatal days in the late developing cerebellar territories.

Examining the developmental plasticity of the cerebellar cortex, we found numerous undifferentiated „extralaminar” (positioned outside of the regular citoarchitectonic structure of the cortex) PCs at perinatal/early postnatal ages in mice and kittens revealed by mGluR1 α immunocytochemistry as well as by toluidine-blue staining. At the same time, PCs were completely missing in smaller territories of the cerebellar cortex. At later stages of development these „gaps” disappeared and the PC layer became continuous. In our earlier experiments, BrdU treatments applied on mice labeled the proliferating cells of the EGL, moreover, highly influenced the migration of the PCs at postnatal ages, consequently, the formation of the ganglionic layer.

The cerebellum is one of the longest developing regions of the central nervous system. It is well known that the complete build up of its neural network finishes well after birth and

is influenced by many external (environmental) and internal (genetic) effects, which means an enhanced plasticity and vulnerability. Understanding of the details of this extended development and its influencing factors would be very useful in the prevention of developmental failures of the cerebellum, perhaps in their therapies as well.

Aims:

- 1.) To highlight the differences in the formation of PC monolayer comparing faster and slower developing cerebellar areas (lobules) and the time of build up of the ganglionic monolayer.
- 2.) To describe the distribution of extralaminar PCs in the developing cerebellar cortex.
- 3.) To clarify the changes in the total number of „laminar” PCs after birth in the whole cerebellum, based on modern stereologic/morphometric methods and to check the statistical significance of these data.
- 4.) To examine the effects of postnatal BrdU treatment on the somatic and cerebellar development of the mouse.
- 5.) To investigate the distribution of PCs disturbed in their migration/settlement after BrdU treatment.
- 6.) What is the fate of PCs in ectopic positions?

Materials and methods

Summary of the applied methods and the number and age of experimental animals.

Aim	Method	Animals	Ages
To examine the formation of the PC layer	Toluidine-blue staining	Mouse (18)	P0, P3, P6, P8, P15, P21
		Cat (9)	P0, P14, P42
Development of PCs in cats	mGluR1 α immunohistoch.	Cat (12)	P0, P8, P22, P42
Development of PCs in mice	mGluR1 α immunohistoch.	Mouse (18)	P0, P3, P6, P8, P15, P21

	CaBP immunohistochem.	Mouse (15)	P6, P9, P12, P16, Ad.
Counting PCs in lobules III and VI.	Counting CaBP ⁺ PCs	(the same as previous)	P6, P9, P12, P16, Ad.
Studying the growth of PC monolayer	Measuring the length of PC layer	Mouse (27)	P0, P3, P4, P6, P12, P15, P18, P21, AD
Counting the total number of PCs in the whole cerebellum	Optical fractionator	Mouse (9)	P8, P21, AD
		Cat (12)	P0, P42, P72, AD
Disturbing the cerebellar development	BrdU-treatment	Mouse (75)	P0-P21, AD

Results and discussion

Development of PC layer in the cerebellar cortex of laboratory mouse

Incorporation of PCs into the cerebellar cortex

We studied the postnatal development of the ganglionic layer of PCs in the mouse. PCs were identified by traditional histological and immunocytochemical staining. The length of the PC layer increased by 6-7 times as measured in mediansagittal sections of the vermis because of the rostrocaudal arrangement of PCs after birth. In newborn (P0) mice PCs were arranged into multiple rows in several territories of the vermis or they were dispersed in the medullary parenchyma. At postnatal days P3 and P4, PCs were arranged in multiple rows except the dorsal part of vermal lobules VI, VII, and VIII. At P6 and P8 PCs formed a more or less regular monolayer, the ganglionic layer, however, in the dorsal area of the vermal lobules VI. and VII. the arrangement of PCs was still irregular. By P12/15 PCs were missing from the ganglionic layer, at certain areas of lobule VI. The citoachitectonic build up of the cerebellum was completed by P21, by postnatal age the EGL disappeared.

Investigating the developmental dynamics and morphogenesis of the vermal lobules, we observed an altered development of the lobules VI. and VII. The alignment of PCs into monolayer was completed only by P15-16 in the dorsal part of the lobules VI. and VII. indicating a delayed postnatal development of the visuomotor vermis and its ganglionic layer. Our results give further evidences to the observations that the cerebellum develops for a long time after birth, including the ganglionic layer as well. Comparing individuals at different ages it turned out that the alignment of PCs completed earlier in the anterior and medial lobules than in the late developing (posterior and lateral, as well as vermal lobules VI. and VII.) areas.

Number of CaBP immunopositive PCs in the oculomotor vermis

We investigated the alignment and morphogenetic dynamics of PCs by the help of calcium binding protein (CaBP, Calbindin) immunocytochemistry in the developing cerebellar cortex of mice. The number of CaBP positive PCs in the monolayer increased gradually from 100 cells to 150 cells/row in lobules VI. and VII. from age P6 to young adulthood, which means 50% increase. There was also an increase in lobule III. between P6 and P16 (from 76 to 105 cells/row) followed by a moderate, not significant decrease until the young adulthood (altogether 24% increase). The above numerical data support also the altered development of vermal lobule VI and VII. In these lobules, the increase of the number of settled (CaBP immunopositive) PCs is a slower developmental process and lasts for a longer time in comparison to the relatively earlier developing anterior lobule III.

Most probably, the majority of PCs do not express CaBP until they start to differentiate – including the growth and remodelling of their dendritic tree – settled into the ganglionic lamina (or in ectopic position). This could be an explanation of our observation, that there were no CaBP immunopositive PCs in deeper regions of lobules VI. and VII.

Changes in the number of PCs in the cerebellar cortex at postnatal ages

There are only sporadic data in the literature about the changes in the number of PCs at postnatal ages. Therefore, it was an important part of our work to estimate the number of PCs in the postnatal developing and adult cerebellum of the mouse. We observed 11,5% and 13,4% increase in the number of PCs between P8 - P20 and P8 - young adult, respectively. The increase suggested the presence of a late migrating (extralaminar) subpopulation of PCs. The late and delayed migration and incorporation of this subpopulation of PCs occurred predominantly during the second postnatal week, however, the migration might continue on the third postnatal week at a lower rate, too. The delayed development (late migration and incorporation of PCs) of the visuomotor vermis might be related to its enhanced vulnerability.

Development of PC layer in the cat

Morphological changes revealed by toluidine-blue staining and mGluR1a immunohistochemistry

From P0 onwards the double-layered arrangement of the PCs, that was seen at certain neocerebellar and vermal areas, transformed into regular monolayer by P14. PCs were missing from distinct areas („gaps”) until the 3rd postnatal week. By P42 PCs built up a regular monolayer in the whole cerebellum.

In the cerebellar cortex of newborn kittens strong mGluR1 α immunoreaction was seen in the somata and dendrites of PCs. At the same time, „gaps” were seen in sagittal (serial) sections in the rows of PCs. In these gaps 15-25 PCs were completely missing from the ganglionic lamina. Undifferentiated, mGluR1 α positive, immature (extralaminar) PCs appeared often in cohorts until P7 close to those areas lacking PCs. From P22 on these gaps in the rows of PCs disappeared. The number of extralaminar PCs - appearing in the EGL, in the cerebellar peduncles, at the dorsal surface of the brainstem, and in the cerebellar white matter - decreased gradually, and disappeared until adulthood.

Changes in the number of PCs in the cerebellar cortex of cat after birth

The number of laminar PCs differs significantly in P72 ($1,896 \pm 0,105 \times 10^6$) and adult ($1,429 \pm 0,064 \times 10^6$) cats compared to the newborn ($1,097 \pm 0,094 \times 10^6$) kittens. ($P=0,0024$; $p<0,01$, ANOVA: $F_{3,7} = 13,02$; Bonferroni: $P<0,01$). The measure of the increase was 72% and 30% between P0 and P72 and between P0 and adult, respectively.

Our results show that there is a long lasting postnatal increase – around 30% – in the total number of PCs in the cat, too. We observed „gaps” (vacancies in the PC layer) in the developing cerebellar cortex of kittens at perinatal ages. Changes in the number of PCs of the ganglionic layer, measured by quantitative stereological methods (optical fractionator) during perinatal 2-3 weeks, can be explained by „filling-up” the gaps with extralaminar, mGluR1 α immunopositive, undifferentiated (migrating) PCs.

Our results suggest that PCs may incorporate into the existing and developing monolayer in both species studied at postnatal ages.

Effect of BrdU treatment on somatic and cerebellar development

Effect on somatic development

We have developed an experimental model (BrdU treatments at different ages and intervals) in order to study the postnatal developmental plasticity of the cerebellum. BrdU

administrations resulted in more or less severe cerebellar damages. C57Bl6 mice were injected with BrdU at a relatively low dose (50 mg/bw kg) after birth. Series of treatments, from P0 to P11 resulted in significant decrease in the body weight and in severe somatic retardation. The decrease/difference in the body weight was observed until young adulthood (P120), compared to the individuals of the control groups.

The effect of BrdU administration on development of the nervous system

The size of the brain/cerebellum decreased also after BrdU treatments. Both the cross-sectional area of the vermis and the length of the ganglionic layer decreased significantly, and the citoarchitectonical structure of the cerebellum was damaged, too. Following BrdU administration from P0 to P11, the ganglionic layer was built up by somata of PCs arranged in irregular, multiple rows, and this alteration persisted at later ages as well.

Changes in the cerebellar lobular structure

The basic lobular structure of the vermis was intact after BrdU administration, however, minor disturbances in the structure of the lobules were obvious in the cerebellum restricted dominantly to the late developing lobules IV. – V. (their typical shape was not formed) and VI. -VII., in the latter ones the sub-lobules were not separated.

Developmental disturbances of the granular layer

The migration of granule cells were altered after BrdU treatment; their smaller groups remained in the external granular layer (EGL), moreover, the groups were seen at P21, especially in the dorsal part of late developing lobules VI. and VII. Small groups of granule cells were observed in ectopic positions under the pia mater at P120 following early postnatal BrdU treatment between P0-P11.

Changes in the development of PC layer

The BrdU administration highly influenced the migration of a proportion of PCs; these PCs did not migrate and did not incorporate into the ganglionic layer. We found large number of ectopic PCs in the relatively late differentiating rostral – neocerebellar – areas (lobulus simplex, lobus anterior), in the flocculus/paraflocculus and visuomotor vermis (declive,

tuber), moreover, in the sub-ventricular zone of the IVth ventricle, at the border of the mesencephalon/metencephalon. PCs disturbed in their postnatal migration were observed in ectopic position in the IGL, at the border of the IGL and the white matter, and in the white matter of the cerebellum.

On the basis of our investigations the effectiveness of BrdU treatments depended on two factors: the age of the animals at the beginning of treatment and the duration (time interval) of the treatment. BrdU application resulted, first of all, in the damage of granule cells and their precursors as well as in the decrease of their number. BrdU administration delayed and blocked the morphogenetic processes, especially the normal alignment and migration of PCs, and caused moderate granule cell ectopia, too. BrdU treatment significantly retarded the development of the cerebellum, which lead to cerebellar hypoplasia and permanent citoarchitectonic damage. Early BrdU treatment started at P0 influenced especially that subpopulation of PCs, supposed to be able to migrate and incorporate into the ganglionic layer during an extended developmental period. Our opinion is that BrdU treatment disturbed the migration of this population of PCs and prevented their normal integration into the ganglionic layer resulting in significant PC ectopia.

Summary of the results

We summarize our most important results as follows:

- 1./ We observed about 1 week delay in the development of cortical area of the lobules VI.-VII. compared to the lobule III. in the vermis of the mouse. The build up of the cortex was completed around postnatal days 15-16 in the lobules VI-VII.
- 2./ Extralaminar PC were observed and identified – on semithin sections in the case of the mice, and on the basis of their dendritic morphology as well as based on their mGluR1a immunoreactivity – in deeper territories of the cerebellar cortex on the 2nd and 3rd weeks after birth.
- 3./ In the developing cerebellar cortex the number of PC increased significantly both in mice

and cats, based on strict criteria of stereological methods.

4./ Postnatal BrdU administration resulted in the retardation of somatic and cerebellar development. The effect of BrdU depended on the onset and duration of the treatment (cumulative BrdU doses). First of all the rapidly proliferating granule cells were damaged following BrdU administration, however, the postnatal migration and integration of Purkinje cells were also seriously disturbed.

5./ As far as the distribution of Purkinje cells in ectopic position(s) concerns, they appeared in the whole cerebellar cortex, but in higher number in the flocculo-nodular lobe, as well as in the late developing visuomotor vermis.

6./ A smaller proportion of Purkinje cells in ectopic position were able to integrate – more or less regularly – into the ganglionic lamina. Purkinje cells in the white matter were mostly degraded, and in a smaller proportion persisted as ectopic cells.

List of publications

Publications on the subject of the thesis

Takács J, Borostyánkői ZA, Veisenberger E, **Vastagh Cs**, Víg J, Görös TJ, Hámori J. 2000. Postnatal development of unipolar brush cells in the cerebellar cortex of cat. *J Neurosci Res* 61:107-115.

Vastagh Cs, Víg J, Hámori J, Takács J. 2005a. Delayed postnatal settlement of cerebellar Purkinje cells in vermal lobules VI and VII of the mouse. *Anat Embryol (Berl)* 209:471-484.

Vastagh Cs, Víg J, Takács J, Hámori J. 2005b. Quantitative analysis of the postnatal development of Purkinje neurons in the cerebellum of the cat. *Int J Dev Neurosci* 23:27-35.

Conference abstracts on the subject of the thesis:

- Takács J, Borostyánkői Zs, **Vastagh Cs**, Víg J, Görcs T, Hámori J. 2000. Development of the cerebellar cortex in cats. *Neurobiology* 8(3-4):404
- Vastagh Cs**, Takács J, Hámori J. 2001. The number of Purkinje cells changes during postnatal development in the cerebellar cortex of cat. *Neurobiology* 9(3-4):272
- Takács J, Víg J, **Vastagh Cs**, Hámori J. 2003. Effect of BrdU on the postnatal development of cerebellum. MITT IX. Conference, Balatonfüred, 2003. jan. 22-25. *Clinical Neuroscience* 56(suppl 2): 89
- Takács J, Víg J, **Vastagh Cs**, Hámori J. 2003. Effect of 5-bromo-2'deoxyuridine (BrdU) on the postnatal development of cerebellum. 6th IBRO World Congress of Neuroscience, Prague, 2003. Sixth IBRO World Congress of Neuroscience, July 10-15, 2003, Prague, Suppl Eur J Neurosci, pp. 144.

Acknowledgement

I would like to express my thanks to my supervisor, Dr. József Takács, professor József Hámori, Dr. Julianna Víg, to my colleagues in the Neurobiology Research Group of the Hungarian Academy of Sciences at the Semmelweis University, and in the Department of Zoology and Neurobiology at the University of Pécs, and to my family, for helping and supporting my work during the last years.